



北海道公立大学法人
札幌医科大学
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	Surfactant protein D inhibits activation of non-small cell lung cancer-associated mutant EGFR and affects clinical outcomes of patients (SP-D は EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌の進行を抑制し、患者の予後を改善する)
Author(s) 著 者	梅田, 泰淳
Degree number 学位記番号	乙第 2978 号
Degree name 学位の種別	博士 (医学)
Issue Date 学位取得年月日	2017-11-02
Original Article 原著論文	Oncogene, 2017, in press
Doc URL	
DOI	
Resource Version	Author Editition

学位論文の内容の要旨

報 告 番 号	乙第 2978 号	氏 名	梅田 泰淳
<p>【論文題名】</p> <p>Surfactant protein D inhibits activation of non-small cell lung cancer-associated mutant EGFR and affects clinical outcomes of patients</p> <p>肺サーファクタント蛋白質 D は上皮成長因子受容体遺伝子変異陽性非小細胞肺癌の進行を抑制し、患者の予後を改善する。</p> <p>【研究目的】</p> <p>上皮成長因子受容体(EGFR)は、肺腺癌では過剰発現しており、癌の増殖シグナル伝達の起点である。肺腺癌細胞では、細胞内の EGFR チロシンキナーゼドメインの変異により、リガンド非依存的に恒常的に活性化するようになる。EGFR 遺伝子変異の多くは、エクソン 19 の欠失変異 (Ex19del)とエクソン 21 の点変異 (L858R)であり、これらの変異はゲフィチニブなどの EGFR チロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)に高い感受性をもつ。野生型 EGFR は、活性化にリガンド刺激による二量体形成が必要であるが、Ex19del と EGFR-TKI に耐性を持つ T790M 変異では二量体形成を必要としない。</p> <p>肺サーファクタントタンパク質 D(SFTPD)は、C 型レクチンのコレクチンファミリーに属しており、肺の自然免疫に関与している。SFTPD は血中にも存在し、間質性肺炎の血清バイオマーカーとなっている。</p> <p>我々はこれまでに、野生型 EGFR を発現する肺腺癌細胞において、SFTPD は、EGF と EGFR の結合を阻害し、その下流シグナルを抑制することにより抗腫瘍活性を持つことを報告した。今回、SFTPD が変異型 EGFR を発現する肺腺癌細胞においても抗腫瘍活性を有しているかを基礎的に検討し、肺腺癌患者を対象に血清 SFTPD 値と EGFR 遺伝子変異の有無、予後との関係について臨床的に検討した。</p> <p>【研究方法】</p> <p>1. SFTPD の EGFR シグナルへの影響について、野生型 EGFR、TKI 感受性の Ex19del、L858R、および TKI 耐性の Ex19del/T790M、L858R/T790M の各変異型 EGFR を安定発現させた CHOK1 細胞を作成し、検討した。同様に TKI 感受性のヒト肺腺癌細胞株 HCC827 細胞、HCC4006 細胞 (ともに Ex19del)と H3255 細胞 (L858R)、TKI 耐性のヒト肺腺癌 H1975 細胞 (L858R/T790M) でも検討した。</p>			

2. TKI 感受性の HCC827 細胞、HCC4006 細胞と H3225 細胞、TKI 耐性の H1975 細胞に対して、WST-1 を用いた細胞増殖アッセイ、トランスウェルダブルチャンバーを用いた細胞遊走、浸潤アッセイを行った。
3. SFTPD が EGFR の細胞膜上の発現に与える影響を、細胞表面をビオチン化し、抗 EGFR 抗体で免疫沈降を行うことで検討した。また Ligand blot により SFTPD が変異型 EGFR に直接結合するかを検討した。さらに Lectin blot により変異型 EGFR にオリゴマンノース型糖鎖が存在するかを確認した。
4. 変異型 EGFR の二量体における SFTPD の影響について、BS³を用いた cross-linking assay で検討した。
5. 野生型と変異型 EGFR の活性化が二量体形成に依存するかについて、EGFR 細胞内ドメインの N-lobe 変異 (I709Q)、C-lobe 変異 (V948R) を CHOK1 細胞に安定発現させ、検討した。
6. 二量体形成に依存しない活性を持った Ex19del、及び T790M と I709Q または V948R を発現した CHOK1 細胞において SFTPD の効果を評価した。
7. EGFR-TKI と SFTPD の併用効果について、細胞増殖アッセイで検討した。
8. EGFR と SFTPD の肺腫瘍内での局在を、L858R 変異をもつ肺腺癌患者の手術検体を用い免疫組織学的に検討した。
9. 札幌医科大学附属病院に受診歴のある肺腺癌患者 121 名を対象に、血清 SFTPD 値と EGFR 遺伝子変異の有無、予後との関係について臨床的に検討をした。

【結果】

1. SFTPD は、野生型 EGFR、TKI 感受性および TKI 耐性の各変異型 EGFR を安定発現させた CHOK1 細胞において、リガンド依存性・非依存性の EGFR リン酸化、Erk リン酸化、Akt リン酸化を抑制した。また TKI 感受性と耐性のヒト肺腺癌細胞株でも同様の結果であった。
2. いずれの細胞においても、SFTPD によって細胞増殖、遊走、浸潤が抑制された。
3. SFTPD は細胞膜表面の EGFR の発現には影響を与えなかった。Ligand blot ではいずれの細胞でも、メンブレン上の EGFR に SFTPD が結合した。Lectin blot では、Concanavalin A、DSA いずれのレクチンでも band が検出され、変異型 EGFR もオリゴマンノース型の糖鎖が存在することを確認した。
4. TKI 感受性の HCC827、H3255 細胞において、リガンド存在下での二量体形成を SFTPD が阻害し、またリガンド非存在下での二量体形成も SFTPD によって阻害した。TKI 耐性の H1975 細胞でも同様の結果であった。
5. 野生型及び L858R を発現させた CHOK1 細胞では、I709Q または V948R 変異により EGFR リン酸化は抑制されたが、Ex19del、Ex19del/T790M、L858R/T790M を発現させた CHOK1 細胞では EGFR リン酸化は抑制されなかった。

6. 二量体に依存しない変異型 EGFR の活性化も SFTPD は抑制することを確認した。
7. TKI 感受性細胞、TKI 耐性細胞のいずれもゲフィチニブ単独群と比べゲフィチニブと SFTPD 併用群で細胞増殖がより抑制された。ゲフィチニブ耐性の H1975 細胞では、T790M にも感受性を持つ第三世代 EGFR-TKI と SFTPD を併用すると、単独投与と比べ細胞増殖がより抑制された。
8. EGFR は肺腔側に比較し基底膜側に多く発現していた。SFTPD は肺腔側により強く発現していたが、間質にも発現していた。これらの所見より EGFR と SFTPD が腫瘍内で相互作用する可能性が示唆された。
9. EGFR-TKI で治療を受けた EGFR 遺伝子変異陽性患者では、血清 SFTPD 高値群は、低値群と比較して全生存期間（OS）、無増悪生存期間（PFS）の有意な延長を認めた。EGFR 遺伝子変異陽性患者の血清 SFTPD 高値群と低値群の患者特性を比較すると、遠隔転移の臓器数が高値群で有意に少なかった。多変量解析により、SFTPD 値は有意な予後規定因子であった。

【考察】

リガンド刺激により活性化する野生型 EGFR と同様に、リガンド非依存性でも活性化する変異型 EGFR においても、SFTPD は EGFR のオリゴマンノース型糖鎖に結合し、二量体形成を阻害した。それにより変異型 EGFR の自己リン酸化と下流シグナルも抑制し、細胞増殖、遊走能を抑制した。また、SFTPD は、変異型 EGFR の二量体に依存しない活性化も阻害した。また、SFTPD と EGFR-TKI の併用により、単独投与と比べて細胞増殖はより抑制され、SFTPD は、EGFR-TKI と相加的な細胞増殖抑制効果を認めた。その抗腫瘍効果は、EGFR-TKI とは別な作用であることから、今後新たな治療薬の開発の一助になると考えられた。

EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌患者において、血清 SFTPD 高値群は、低値群と比べ有意に予後良好であり、遠隔転移の臓器数が少なかった。血清 SFTPD 高値は、SFTPD がもつ抗腫瘍効果により、予後の改善に影響を与えた可能性が考えられた。血清 SFTPD 値は、EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌における EGFR-TKI の効果予測の新たなバイオマーカーとなることが示唆された。

【結語】

変異型 EGFR を有する肺腺癌細胞においても SFTPD は抗腫瘍活性を持つことを明らかにした。EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌患者において、血清 SFTPD 値は、EGFR-TKI の効果予測する新たなバイオマーカーとなることが示唆された。

論文審査の要旨及び担当者

平成 29 年 10 月 23 日 提出 (平成 29 年 11 月 2 日授与)

報告番号	乙第 2978 号	氏 名	梅田 泰淳
論文審査 担 当 者	主査 高橋 弘毅 教授	副査 渡辺 敦 教授	
	委員 高橋 素子 教授	委員 佐久間 裕司 准教授	

論文題名	Surfactant protein D inhibits activation of non-small cell lung cancer-associated mutant EGFR and affects clinical outcomes of patients 肺サーファクタント蛋白質 D は上皮成長因子受容体遺伝子変異陽性非小細胞肺癌の進行を抑制し、患者の予後を改善する。
結果の要旨 <p>本研究では、変異型 EGFR を発現する肺腺癌細胞において、SP-D は EGF シグナルを制御し抗腫瘍活性をもつかについて基礎的に検討し、肺腺癌患者を対象に、血清 SP-D 値と EGFR 遺伝子変異の有無、予後との関係について臨床的に検討した。</p> <p>SP-D は、変異型 EGFR において、EGFR リン酸化とその下流シグナルを抑制し、細胞増殖、遊走、浸潤を抑制した。SP-D は、変異型 EGFR の二量体形成を阻害するだけではなく、二量体形成に依存しない活性化も抑制した。変異型 EGFR をもつ肺腺癌細胞株において、SP-D は EGFR-TKI と相加的な細胞増殖抑制効果を認めた。EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌患者において、血清 SP-D 高値群では、遠隔転移が少なく、全生存期間と無増悪生存期間は有意に延長していた。血清 SP-D 値は、多変量解析により EGFR 遺伝子変異陽性肺癌患者の予後規定因子であった。</p> <p>変異型 EGFR を有する肺癌細胞株において、SP-D は抗腫瘍活性をもち、EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌患者において、血清 SP-D 値は EGFR-TKI の効果を予測する新たなバイオマーカーとなることが示唆された。</p> <p>以上の新知見を提供し、博士論文に値するとの評価をいただいた。</p>	